



⑮ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENTAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 196 44 567 A 1**

⑤ Int. Cl.⁶:
C 12 N 15/54
C 12 N 1/00
C 12 N 1/21
C 12 P 1/00
C 12 P 1/04
C 12 P 13/22
C 07 C 229/36

⑦ Aktenzeichen: 196 44 567.1
② Anmeldetag: 26. 10. 96
④ Offenlegungstag: 30. 4. 98

// (C12N 15/54,C12R 1:01)(C12N 15/54, C12R 1:19)(C12N 1/21, C12R 1:19)(C12P 1/04, C12R 1:19)(C12P 13/22,C12R 1:19) (C12N 9/12,C12R 1:01) (C12N 9/10,C12R 1:19)

⑦ Anmelder:
Forschungszentrum Jülich GmbH, 52428 Jülich,
DE; Holland Sweetener Co. V.o.F., Maastricht, NL

⑧ Vertreter:
Struck, N., Dipl.-Phys. Dr.rer.nat., Pat.-Ass., 52477
Alsdorf

⑦ Erfinder:
Sprenger, Georg, Dr., 52428 Jülich, DE; Siewe,
Ruth, Dr., 76137 Karlsruhe, DE; Sahm, Hermann,
Prof. Dr., 52428 Jülich, DE; Karutz, Martin, Sittard,
NL; Sonke, Theodorus, Guttekoven, NL

⑤ Entgegenhaltungen:
EP 01 83 006 A2
Ann. Rev. Microbiol. 49, 1995, S.557-79;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤4 Mikrobielle Herstellung von Substanzen aus dem aromatischen Stoffwechsel / II

⑤7 Die Erfindung stellt, durch eine erhöhte Bereitstellung von intrazellulären Stoffwechselintermediaten, insbesondere von Phosphoenolpyruvat, alternative Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Substanzen, insbesondere von aromatischen Aminosäuren wie L-Phenylalanin zur Verfügung, bei denen die Aktivität einer Zucker-phosphorylierenden Kinase in einem diese Substanzen produzierenden Mikroorganismus erhöht wird. In bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung wird zusätzlich die Aktivität eines Transportproteins zur PEP-unabhängigen Aufnahme eines von der Kinase zu phosphorylierenden Zuckers, bzw. die Aktivität einer Transaldolase und/oder einer Transketolase erhöht. Die Erfindung betrifft auch Genstrukturen, sowie diese Genstrukturen tragenden transformierten Zellen, welche eine besonders erfolgreiche Realisation dieser Verfahren ermöglichen.

DE 196 44 567 A 1

DE 196 44 567 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Substanzen, insbesondere von aromatischen Aminosäuren, nach Anspruch 1-20, 36 und 37, Genstrukturen nach Anspruch 21-29, sowie transformierte Zellen nach Anspruch 30-35.

Mikrobiell hergestellte Substanzen, wie Feinchemikalien, insbesondere aromatische Aminosäuren sind von großem wirtschaftlichen Interesse, wobei der Bedarf an z. B. Aminosäuren weiterhin zunimmt. So wird beispielsweise L-Phenylalanin zur Herstellung von Medikamenten und insbesondere auch bei der Herstellung des Süßstoffes Aspartam (α -L-Aspartyl-L-phenylalaninmethylester) verwendet. L-Tryptophan wird als Medikament und Zusatz zu Futtermitteln benötigt; für L-Tyrosin besteht ebenfalls Bedarf als Medikament, sowie als Rohstoff in der pharmazeutischen Industrie. Neben der Isolierung aus natürlichen Materialien ist die biotechnologische Herstellung eine sehr wichtige Methode, um Aminosäuren in der gewünschten optisch aktiven Form unter wirtschaftlich vertretbaren Bedingungen zu erhalten. Die biotechnologische Herstellung erfolgt entweder enzymatisch oder mit Hilfe von Mikroorganismen.

Die letztere, mikrobielle Herstellung hat den Vorteil, daß einfache und preisgünstige Rohstoffe eingesetzt werden können. Da die Biosynthese der Aminosäuren in der Zelle aber in vielfacher Weise kontrolliert wird, sind bereits vielfältige Versuche zur Steigerung der Produktbildung unternommen worden. So wurden z. B. Aminosäure-Analoga eingesetzt, um die Regulation der Biosynthese auszuschalten. Beispielsweise wurden durch Selektion auf Resistenz gegen Phenylalanin-Analoga Mutanten von *Escherichia coli* erhalten, die eine erhöhte Produktion von L-Phenylalanin ermöglichen (GB-2,053,906). Eine ähnliche Strategie führte auch zu überproduzierenden Stämmen von *Corynebacterium* (JP-19037/1976 und JP-39517/1978) und *Bacillus* (EP-0,138,526).

Desweiteren sind durch rekombinante DNS-Techniken konstruierte Mikroorganismen bekannt, bei denen ebenfalls die Regulation der Biosynthese aufgehoben ist, indem die Gene, die für nicht mehr feedback-inhibierten Schlüsselenzyme kodieren, kloniert und exprimiert werden. Als ein Vorbild beschreibt EP-0,077,196 ein Verfahren zur Produktion von aromatischen Aminosäuren, bei dem eine nicht mehr feedback-inhibierte 3-Desoxy-D-arabino-heptulosonat-7-phosphat synthase (DAHP-Synthase) in *E. coli* überexprimiert wird. In EP-0,145,156 ist ein *E. coli*-Stamm beschrieben, in dem zur Produktion von L-Phenylalanin zusätzlich Chorismatmutase/Prephenaldehydratase überexprimiert ist.

Den genannten Strategien ist gemeinsam, daß sich der Eingriff zur Verbesserung der Produktion auf den für die aromatischen Aminosäuren spezifischen Biosyntheseweg beschränkt. Für eine weitere Erhöhung der Produktion muß jedoch eine verbesserte Bereitstellung der zur Produktion aromatischer Aminosäuren benötigten Primärmetabolite Phosphoenolpyruvat (PEP) und Erythrose-4-Phosphat (Ery4P) angestrebt werden.

PEP ist ein aktivierter Vorläufer des Glycolyseproduktes Pyruvat (Brenztraubensäure); Ery4P ist ein Intermediat des Pentosephosphatweges.

In der Literatur sind mehrere Strategien für die Steigerung der Verfügbarkeit von PEP beschrieben, wie beispielsweise durch Verminderung der Aktivität der PEP-Carboxylase (Miller J.E. et al., *J. Ind. Microbiol.* 2 (1987) 143-9; EP-0,140,606) oder durch Steigerung der Aktivität der PEP-Synthase (Chao Y.P. et al., *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 5122-26; Patniak R. et al., *Biotechnol. Bioeng.* 46 (1995) 361-70). Weiterhin wurde gefunden, daß in Thiamin- und Liponsäure-auxotrophen Mutanten von *Enterobacter aerogenes* die Aktivität des Pyruvaldehydhydrogenasekomplexes vermindert ist, wodurch der Abfluß von PEP über Pyruvat zu Acetyl-CoA und in dem Zitronensäurezyklus verringert und in der Folge Tryptophan gebildet wurde (Oita S. et al., *J. Fern. Bioeng.* 69 (1990) 256-8). Desweiteren verbrauchen Mikroorganismen, die Glucose über ein PEP : Zucker-Phosphotransferasesystem (PTS) aufnehmen (pts⁺-Stämme), äquimolare Mengen PEP für diesen Transportvorgang mit der Folge, daß dieses PEP nicht mehr für die Synthese aromatischer Verbindungen zur Verfügung steht (Postma P.W. et al., *Microbiol. Rev.* 57 (1993) 543-594).

Kürzlich wurde gezeigt (Flores N. et al., *Nature Biotechnol.* 14 (1996) 620-3), daß eine spontane Glucose-positive Revertante einer PTS-negativen (pts⁻) Mutante von *Escherichia coli* Glucose über das GalP-System in die Zellen einschleuste und zum Wachstum auf Glucose befähigt war. Durch zusätzliche Expression des Transketolase-Gens *tktA* wurde in dieser Arbeit eine vermehrte Bildung des Intermediaten DAHP beobachtet. Frost und Drahts ziehen die Möglichkeit in Erwägung, die Bereitstellung von PEP zu verbessern, indem das PTS völlig inaktiviert und anschließend die Gene *glf* und *glk* aus *Zymomonas mobilis* überexprimiert werden (Frost und Drahts, *Ann. Rev. Microbiol.* 49 (1995) 557-79). Aus diesem Artikel ist eine Aussage über die Effizienz eines derartigen Eingriffes jedoch nicht möglich, ebensowenig wie es nicht möglich ist, etwaige Folgen eines derartigen Eingriffes auf die Produktion von aromatischen Intermediaten in pts⁺-Stämmen abzuschätzen.

Es ist daher Aufgabe der Erfindung, ein alternatives Verfahren zur Produktion von Substanzen, insbesondere aromatischen Aminosäuren, zur Verfügung zu stellen, welches sich durch eine erhöhte Bereitstellung von PEP für die Synthese dieser Substanzen auszeichnet.

Überraschenderweise wird die Aufgabe erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß ein Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Substanzen zur Verfügung gestellt wird, bei dem die Aktivität einer Zucker-phosphorylierenden Kinase in einem diese Substanzen produzierenden Mikroorganismus erhöht wird.

Dieses Ergebnis ist besonders überraschend, als daß es keineswegs selbstverständlich ist, daß die alleinige Überexpression einer Zucker-phosphorylierenden Kinase eine wesentliche Rolle bei der Bereitstellung von PEP und damit auf die Produktion von Substanzen hat.

Beim Wachstum auf Hexosen, wie Glucose oder Fructose, unter natürlichen Bedingungen, wird der überwiegende Teil dieser Substrate von den bakteriellen Zellen (z. B. von *Escherichia coli*) über PEP : Hexose-Phosphotransferase-Systeme aufgenommen und unter Verbrauch von PEP phosphoryliert. Die Wirkung Zucker-phosphorylierender Kinasen beschränkt sich also auf die Aktivierung von jenen Zuckern, die nicht-phosphoryliert in der Zelle vorliegen, da sie mittels eines PEP-unabhängigen Transportsystems aufgenommen wurden. Derartige Zucker können z. B. aus Hydrolysereaktionen intrazellulär vorliegender Di- und Oligosaccharide wie Trehalose, Lactose, Maltose oder Maltodextrin resultieren.

Beispielsweise hat die Glucokinase in *Escherichia coli* beim Wachstum auf Glucose eine untergeordnete Funktion (Curtis und Lipsiein, *J. Bacteriol.* 122, (1975), 1189-1199). Ein direkter Einfluß auf die Stoffflüsse, sowohl durch die Gly-

kolyse zur Bereitstellung von PEP, als auch durch den Pentosephosphatweg zur Bereitstellung von Ery4P, besteht nicht. Folglich ist der im Rahmen dieser Erfindung beschriebene Effekt der Überexpression einer Zucker phosphorylierenden Kinase auf die Produktion von Substanzen, insbesondere aromatischen Aminosäuren vollkommen unerwartet.

Die Erfinder nehmen an, daß eine Überexpression der Kinase zu einer Erhöhung des intrazellulär vorliegenden Anteil an Zuckerphosphaten führt, dessen Aktivierung auf der Basis von ATP in Funktion dem Energie-Donors, stattfindet. Folglich vermindert sich die zu diesem Zweck eingesetzte Menge an PEP, was der Synthese von PEP-Folgeprodukten förderlich ist. Bisher wurde im Stand der Technik, trotz langjähriger und ausführlichen Arbeiten auf dem Gebiet der Herstellung von Substanzen aus dem aromatischen Stoffwechsel, die alleinige Erhöhung der Aktivität einer Kinase nie postuliert. Unter Substanzen im Sinne der Erfindung sind beispielsweise Feinchemikalien wie aromatische Aminosäuren, Indigo, Indolelessigsäure, Adipinsäure, Melanin, Chinone, Benzoesäure, sowie deren potentielle Derivate und Folgeprodukte oder allgemein Derivate von Intermediaten des Pentosephosphatweges zu verstehen. Alle diese Substanzen werden im Rahmen dieser Erfindung auch als Substanzen aus dem aromatischen Stoffwechsel angesehen. Es sei dabei bemerkt, daß für die Herstellung von Indigo, Adipinsäure und anderen nicht natürlichen Folgeprodukten neben den erfindungsgemäßen Eingriffen weitere genetische Veränderungen an den die Substanzen produzierenden Mikroorganismen notwendig sind.

Das Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Substanzen ist daher besonders vorteilhaft wenn Substanzen hergestellt werden an deren Synthese PEP beteiligt ist.

Beim Einsatz einer Zucker-phosphorylierenden Kinase empfiehlt sich die Verwendung einer Hexosen-phosphorylierenden Kinase, bevorzugt einer Kinase aus *Zymomonas mobilis*, insbesondere der Glucokinase (GK) aus *Z. mobilis* ATCC 10988, ATCC 29191 oder ATCC 31821. Andere Gene für Hexosen-phosphorylierende Kinasen aus Bakterien, deren Genprodukte die Hexosen unter Verbrauch von ATP phosphorylieren, wie beispielsweise eine Fructokinase oder Galactokinase, sind für das erfindungsgemäße Verfahren ebenso geeignet. Weiterhin sind auch Gene für z. B. Kinasen aus eukaryontischen Mikroorganismen geeignet, wie *Saccharomyces cerevisiae* oder allgemein Gene für Zucker-phosphorylierende Kinasen aus anderen Organismen, vorausgesetzt, daß sie in den Mikroorganismen, insbesondere Aminosäuren produzierenden Mikroorganismen (Aminosäureproduzenten), funktionell exprimiert werden können und ohne PEP zur Phosphorylierung der Zucker auskommen. Insbesondere empfiehlt sich, daß die Zucker-phosphorylierende Kinasen in Aminosäureproduzenten exprimiert werden können. Für die Herstellung aromatischer Aminosäuren nach dem erfindungsgemäßen Verfahren eignet sich insbesondere das aus *Z. mobilis* ATCC 29191 isolierte Glucokinase-Gen *glk* für die Phosphorylierung von Glucose.

Durch die Überexpression der Zucker phosphorylierenden Kinase gemäß der vorliegenden Erfindung wird ein alternatives Verfahren zur Verfügung gestellt, durch das über einen vermehrten Gebrauch alternativer Energie-Donoren, wie von ATP als Energie-Donor, der Verbrauch von PEP für die Aktivierung von Zuckern in der Zelle herabgesetzt wird. PEP steht somit in erhöhtem Maße für die mikrobielle Synthese von Substanzen, an deren Synthese PEP beteiligt ist, zur Verfügung.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird zusätzlich zur Erhöhung der Aktivität einer Zucker-phosphorylierenden Kinase die Aktivität eines Transportproteins zur PEP-unabhängigen Aufnahme eines von der Kinase zu phosphorylierenden Zuckers erhöht. Diese Ausführungsform schließt auch ein, daß die Aktivität eines Transportproteins zur PEP-unabhängigen Aufnahme eines solchen Zuckers in einem Substanzen produzierenden Mikroorganismus erhöht wird, der zur Aufnahme eines betreffenden Zuckers mittels eines PEP-abhängigen Transportsystems befähigt ist. Die zusätzliche Integration eines PEP-unabhängigen Transportsystems erlaubt eine erhöhte Bereitstellung nicht-phosphorylierter Zucker in dem die Substanzen produzierenden Mikroorganismus. Diese Zucker können von den jeweiligen zugehörigen Kinasen unter ATP-Verbrauch in aktivierte Zuckerphosphate umgesetzt und dann weiter metabolisiert werden. PEP als Energie-Donor wird für diese Umsetzungen nicht benötigt und steht damit, ausgehend von einem konstanten Stofffluß in der Glykolyse und dem Pentosephosphatweg, vermehrt für die Kondensation mit Ery4P zum primären Metaboliten des allgemeinen Biosyntheseweges für aromatische Verbindungen Desoxy-D-arabino-heptulosonat-7-phosphat (DAHP) zur Verfügung und in der Folge für die Produktion von Substanzen, wie z. B. aromatischen Verbindungen.

Im Falle des Transportproteins wird Aktivität dabei als proteinvermittelte Aufnahmerate verstanden. Zur Erhöhung der Aktivität des PEP-unabhängigen Transportproteins in PTS-negativen Stämmen ist es, im Gegensatz zu der für das *glf*-Gen aus *Zymomonas mobilis* bereits beschriebenen zweistufigen Prozedur, besonders vorteilhaft, daß das Ausschalten des PTS und das Einbringen des Gens für das Transportprotein in einem Schritt geschehen kann. Eine derartige Strategie kann erfindungsgemäß durch die Insertion des Gens in beispielsweise ein Gen des *ptsII*-*cr*-Operons, z. B. in das *ptsI*-Gen oder einen anderen *pts*-locus realisiert werden und erleichtert die Zugänglichkeit der gewünschten Mutanten. Durch diese Vorgehensweise wird der vektorielle Zuckertransport durch die Zellmembran und der daran gekoppelte PEP-abhängige Phosphorylierungsprozeß der Zucker komplett unterbunden. Andere Funktionen des PTS können dabei aufrechterhalten werden.

Die Insertion des Gens des Transportproteins hinter einen Promotor des PTS ist weiterhin vorteilhaft, da die Einführung einer gesonderten Genstruktur entfällt und eine Destabilisierung der rekombinierten Zelle durch die Expression des Proteins, aufgrund des natürlichen Expressionsniveaus, nicht auftritt.

Bezüglich des Transportproteins zur PEP-unabhängigen Aufnahme eines Zuckers empfiehlt sich der Einsatz eines Facilitators, das heißt eines Transportproteins, das nach dem Prinzip der proteinvermittelten erleichterten Diffusion wirkt. Insbesondere bietet sich der Einsatz des Glucosefacilitator-Proteins (GIF) aus *Zymomonas mobilis* an. Bei der Verwendung von letzterem stammt das das Protein kodierende Gen *glf* z. B. aus *Z. mobilis* ATCC 10988, ATCC 29191 oder ATCC 31821. Andere Zuckertransportgene aus Bakterien, deren Genprodukte z. B. Glucose, Fructose oder Saccharose transportieren und dabei kein PEP verwenden, sind für das erfindungsgemäße Verfahren aber ebenso geeignet, wie z. B. das GalP-System aus *Escherichia coli*. Außerdem sind Gene für Zuckertransportsysteme wie *IXT1* bis *IXT7* aus eukaryontischen Mikroorganismen, wie *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia stipitis* oder *Kluyveromyces lactis*, oder allgemein wie Zuckertransportgene aus anderen Organismen einsetzbar, vorausgesetzt, daß sie in den Mikroorganismen funktionell

exprimiert werden können und die Genprodukte dabei ohne PEP zur Phosphorylierung und/oder zum Transport der Zucker auskommen. Insbesondere empfiehlt es sich, daß die Zuckertransportgene in Aminosäureproduzenten exprimiert werden können.

Für die Herstellung aromatischer Aminosäuren nach dem erfindungsgemäßen Verfahren eignet sich daher insbesondere das aus *Z. mobilis* ATCC 31821 isolierte Facilitator-Gen *glf* für die Aufnahme von Zuckern wie Glucose, Fructose oder Mannose. (Parker C. et al., Mol. Microbiol. 15 (1995) 795-802; Weisser P. et al., J. Bacteriol. 177 (1995) 3351-4). Die Einführung insbesondere des *glf*-Gens sollte vorzugsweise in einer niedrigen Genkopienzahl erfolgen, um schädliche Auswirkungen auf die Zelle durch übermäßige Expression von Membranproteinen zu verhindern. So wird beispielsweise für das *glf*-Gen eine Genkopienzahl von 2 bis 5 bevorzugt. Besonders vorteilhaft ist, wie schon oben erwähnt, die

Einführung des *glf*-Gens in eines der Gene des *ptsII-err*-Operons.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird zusätzlich zur Aktivität einer Zucker-phosphorylierenden Kinase oder zur Aktivität einer Zucker-phosphorylierenden Kinase und eines PEP-unabhängigen Transportproteins die Aktivität einer Transaldolase und/oder die Aktivität einer Transketolase erhöht.

Die zusätzliche Aktivitätssteigerung eines dieser letzteren Proteine (das heißt Transaldolase und Transketolase) oder beider Proteine erlaubt eine noch höhere Produktion von Substanzen, insbesondere aromatischen Aminosäuren, dadurch daß Ery4P für die Kondensation mit PEP zum primären Metaboliten des allgemeinen Biosyntheseweges für aromatische Verbindungen Desoxy-D-arabino-heptulosonat-7-phosphat (DAHP) in erhöhtem Maße bereitgestellt wird.

Hinsichtlich der Erhöhung der Aktivität einer Transaldolase wird vorzugsweise die Aktivität einer Transaldolase aus *Escherichia coli* und insbesondere die Aktivität der Transaldolase B (TalB) aus *Escherichia coli* erhöht. Bei der Verwendung des korrespondierenden *talB*-Gens stammt dieses vorzugsweise aus *Escherichia coli* K-12 oder einem davon abgeleiteten Stamm. Daneben ist jedoch auch jedes Gen geeignet dessen Genprodukt eine Reaktion katalysiert, die der der Transaldolase, das heißt der Umsetzung von Sedoheptulose-7-Phosphat plus Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu Ery4P und Fructose-6-Phosphat, entspricht.

Hinsichtlich der Erhöhung der Aktivität einer Transketolase wird vorzugsweise die Aktivität einer Transketolase aus *Escherichia coli* und insbesondere die Aktivität der Transketolase A (TktA) aus *Escherichia coli* erhöht. Bei der Verwendung des korrespondierenden *tktA*-Gens stammt dieses vorzugsweise aus *Escherichia coli* K-12 oder einem davon abgeleiteten Stamm. Daneben ist jedoch auch jedes Gen geeignet, dessen Genprodukt eine Reaktion katalysiert, die der der Transketolase, das heißt der Umsetzung von Ribose-5-Phosphat plus Xylulose-5-Phosphat zu Sedoheptulose-7-Phosphat plus Glycerinaldehyd-3-Phosphat bzw. der Umsetzung von Xylulose-5-phosphat plus Ery4P zu Fructose-6-phosphat plus Glycerinaldehyd-3-phosphat, entspricht.

In Mikroorganismen, in denen der Stofffluß nach Ery4P erhöht ist, kann die Verfügbarkeit von PEP zur Produktion des ersten Intermediaten des aromatischen Aminosäurestoffwechsels limitiert sein. In solchen Fällen kann es vorteilhaft sein, andere PEP-verbrauchende Reaktionen im Metabolismus, wie z. B. die Reaktion des PEP-Zucker-Phosphotransferasesystems (PTS), welches eine PEP-abhängige Zuckeraufnahme katalysiert, sofern anwesend, zu vermindern oder auszuschalten.

Erfindungsgemäß können sowohl Organismen eingesetzt werden, die das natürliche Aktivitätsniveau des PTS aufweisen; es können auch, zur weiteren Verbesserung des Verfahrens, PTS-Mutanten eingesetzt werden, in denen das PTS in seiner Aktivität vermindert ist. Vermindern im Sinne dieser Erfindung bedeutet eine Erniedrigung der Aktivität bis zu einer Restaktivität von 1% der natürlichen Aktivität. Eine derartige Verminderung kann entweder auf enzymatischer Ebene oder durch genetische Methoden erfolgen, z. B. durch Verwendung alternativer, stark reprimierbarer Promotoren zur Expression der *pts*-Gene oder durch Insertion eines *glf*- und/oder eines *glk*-gens in das Chromosom und insbesondere in den Genort des *ptsI*-Gens, was zugleich eine Stabilisierung der rekombinanten DNS im Chromosom (Segregationsstabilität) und damit den Verzicht auf die Verwendung eines Vektors mit sich bringt. Desweiteren kann in Verbindung mit einem regulierbaren Promotor auch durch die Zugabe von Induktoren oder Inhibitoren des entsprechenden Promotors während der Kultivierung Einfluß auf die Aktivität des PTS genommen werden.

Als Maßnahmen zur Steigerung der Aktivität im Sinne der Erfindung sind alle Maßnahmen zu verstehen, die dazu geeignet sind, die Aktivität der Kinase, des Transportproteins, der Transaldolase und der Transketolase zu steigern. Insbesondere sind hierzu geeignet:

Einführung von Genen z. B. mittels Vektoren oder temperenter Phagen;

Erhöhung der Genkopienzahl z. B. mittels Plasmiden mit dem Ziel die erfindungsgemäßen Gene in erhöhter Kopienzahl, von leicht (z. B. 2 bis 5fach) bis zu stark erhöhter Kopienzahl (z. B. 15 bis 50fach), in den Mikroorganismus einzubringen;

Erhöhung der Genexpression z. B. durch Steigerung der Transkriptionsrate z. B. durch Verwendung von Promotorelementen wie z. B. *P_{lac}*, *P_{tet}* oder anderen regulatorischen Nucleotidsequenzen und/oder durch Steigerung der Translationsrate z. B. durch Verwendung einer Konsensusribosomenbindungsstelle;

Erhöhung der endogenen Aktivität von vorhandenen Enzymen z. B. durch Mutationen, die nach klassischen Methoden ungerichtet erzeugt werden, wie beispielsweise durch UV-Bestrahlung oder mutationsauslösenden Chemikalien, oder durch Mutationen, die gezielt mittels gentechnologischer Methoden wie Deletion(en), Insertion(en) und/oder Nucleotidaustausch(e) erzeugt werden;

Erhöhung der Aktivität von Enzymen durch Veränderung der Struktur von Enzymen z. B. durch Mutagenese mit physikalischen, chemischen, molekularbiologischen oder sonstigen mikrobiologischen Methoden;

Verwendung von deregulierten Enzymen, z. B. nicht mehr feedback inhibierten Enzymen;

Einführung entsprechender die deregulierten Enzyme kodierenden Gene.

Auch Kombinationen der genannten und weiteren, analogen Methoden können zur Erhöhung der Aktivität eingesetzt werden. Im Falle von Transportproteinen kann die endogene Aktivität erhöht werden z. B. durch Klonierung des Gens mit beispielsweise o.g. Methoden oder über Selektion von Mutanten mit erhöhtem Transport von Substraten.

Bevorzugt erfolgt die Steigerung der Aktivität dadurch, daß eine Integration des Gens oder der Gene in eine Genstruktur oder in mehrere Genstrukturen erfolgt, wobei das Gen oder die Gene als einzelne Kopie oder in erhöhter Kopienzahl in die Genstruktur eingebracht wird.

Als Genstruktur im Sinne der Erfindung ist ein Gen und jede Nucleotidsequenz zu verstehen, die die erfindungsgemäßen Gene trägt. Entsprechende Nucleotidsequenzen können beispielsweise Plasmide, Vektoren, Chromosomen, Phagen oder andere, nicht zirkulär geschlossene, Nucleotidsequenzen sein.

Für ein Chromosom im Sinne der Erfindung gilt, daß in dieses mindestens ein erfindungsgemäßes Gen inseriert wurde, und daß die entstandene Nucleinsäuresequenz mindestens ein Gen oder eine Genkopie mehr enthält, als natürlicherweise in diesem Chromosom enthalten ist. So führt beispielsweise die homologe Rekombination innerhalb eines Genortes zu einem Chromosom, welches sich von der natürlichen Form nicht notwendigerweise unterscheiden muß. Die durch homologe Rekombination hergestellten Chromosomen sind daher nicht als erfindungsgemäß zu betrachten, sofern die natürliche Anzahl der homologen Gene nicht überschritten wird.

Als Genstruktur im Sinne der Erfindung ist auch eine Kombination oben genannter Genträger, wie beispielsweise Vektoren, Chromosomen und temperenter Phagen zu verstehen, auf die die erfindungsgemäßen Gene verteilt sind. Beispielsweise können zwei Gene glk auf einem Vektor in die Zelle eingebracht werden oder zwei Gene glk in ein Chromosom inseriert werden. Zusätzlich kann z. B. noch ein weiteres Gen durch einen Phagen in die Zelle eingebracht werden. Dasselbe gilt für die anderen erfindungsgemäßen Gene. Andere Kombinationen von Genverteilungen sollen durch diese Beispiele nicht von der Erfindung ausgeschlossen werden. Entscheidend ist jedenfalls, daß die Anzahl der im Mikroorganismus enthaltenen Gene die natürliche Anzahl der entsprechenden Gene übersteigt.

Vorzugsweise wird man z. B. für glf die Zahl der Gene pro gleichwirkendem Gen um einen Faktor 2 bis 5 erhöhen, um die erfindungsgemäße Steigerung der Aktivität zu erreichen. Bei diesen Konzentrationen werden sich keine zelltoxischen Wirkungen einstellen. Jedoch ist es auch denkbar die erfindungsgemäßen Gene in höherer Kopienzahl bis 50 Genkopien einer gleichwirkenden Form in den Mikroorganismus einzubringen.

Im erfindungsgemäßen Verfahren zur Produktion von Substanzen werden bevorzugt Mikroorganismen eingesetzt, in denen ein oder mehrere Enzyme, die zusätzlich an der Synthese der Substanzen beteiligt sind, dereguliert und/oder in ihrer Aktivität erhöht sind.

Dies sind insbesondere die Enzyme des aromatischen Aminosäurestoffwechsels und vor allem DAHP-Synthase, Shikimatkinaase und Chorismatmutase/Prephenatdehydratase, sowie aber auch alle anderen Enzyme, die und der Synthese aromatischer Stoffwechselintermediate und deren Folgeprodukte beteiligt sind.

Für die Herstellung von Substanzen wie beispielsweise Adipinsäure, Gallensäure und Chinonverbindungen, sowie deren Derivate ist neben den erfindungsmäßigen Enzymen besonders die Deregulation und Überexpression der DAHP-Synthase von Bedeutung. Zur überhöhten Synthese von beispielsweise L-Tryptophan, L-Tyrosin, Indigo, Derivaten von Hydroxy- und Aminobenzoesäure und Naphto- und Anthroquinonen, sowie deren Folgeprodukten sollte zusätzlich die Shikimatkinaase dereguliert und in ihrer Aktivität erhöht werden. Für eine effiziente Produktion von Phenylalanin, Phenylbrenztraubensäure und deren Derivaten ist zusätzlich eine deregulierte und überexprimierte Chorismatmutase/Prephenatdehydratase von besonderer Bedeutung. Jedoch sollen damit auch alle anderen Enzyme umfaßt sein, deren Aktivitäten zur biochemischen Synthese von Substanzen beitragen, das heißt Verbindungen deren Produktion durch die Bereitstellung von PEP begünstigt wird, z. B. CMP-Ketodesoxyoctulosonsäure, UDP-N-Acetylmuraminsäure, N-Acetylneuraminsäure oder Chorisminsäure. Die vermehrte Bereitstellung von PEP kann sich dabei nicht nur positiv auf die Synthese von DAHP auswirken, sondern kann auch die Einführung einer Pyruvat-Gruppe bei der Synthese von 3-Enolpyruvylshikimat-5-phosphat als Vorläufer von Chorismat begünstigen.

Es sei bemerkt, daß für die Herstellung von Indigo, Adipinsäure und anderen nicht natürlichen Folgeprodukten neben den erfindungsgemäßen Eingriffen weitere genetische Veränderungen an den Substanzenproduzierenden Mikroorganismen notwendig sind.

Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich zur Herstellung von aromatischen Aminosäuren, insbesondere von L-Phenylalanin. Im Falle von L-Phenylalanin wird dabei vorzugsweise die Genexpression und/oder die Enzymaktivität einer deregulierten DAHP-Synthase (z. B. in *E. coli* AroI oder AroII) und/oder einer ebenfalls deregulierten Chorismatmutase-/Prephenatdehydratase (PheA) erhöht.

Als Produktionsorganismen eignen sich *Escherichia*-Arten, sowie aber auch Mikroorganismen der Gattungen *Serratia*, *Bacillus*, *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* und weitere aus klassischen Aminosäureverfahren bekannte Stämme. Besonders geeignet ist *Escherichia coli*.

Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist die Bereitstellung von geeigneten Genstrukturen und diese Genstrukturen tragenden transformierten Zellen, welche eine besonders erfolgreiche Realisation des Verfahrens ermöglichen.

Im Rahmen der Erfindung werden jetzt erstens neue Genstrukturen zur Verfügung gestellt, die in rekombinanter Form ein Gen kodierend für eine Zucker-phosphorylierende Kinase und ein Gen für ein Transportprotein zur PEP-unabhängigen Aufnahme eines Zuckers enthalten, mit der Ausnahme von der Kombination der Gene für die Kinase glk und für das Transportprotein glt aus *Zymomonas mobilis*. Die Ausnahme der alleinigen Kombination der Gene glk und glf aus *Zymomonas mobilis* basiert darauf, daß eine derartige Genstruktur schon des öfteren in der Literatur beschrieben wurde. Hintergrund dieser Arbeiten war die Untersuchung der Exprimierbarkeit des glf- und des glk-Gens aus *Zymomonas mobilis* in *Escherichia coli* und der Möglichkeit auf diese Weise Wachstum von PIS-Mutanten auf PIS-Zuckern zu ermöglichen (Snoep et al., J. Bacteriol. 176 (1994) 2133-35). Aus den Ergebnissen ist jedoch eine Auswirkung vor allem von Glk auf die Herstellung von erfindungsgemäßen Substanzen nicht ersichtlich oder zu erwarten. Die neuen Genstrukturen sind daher unerwarteterweise wirksam für die Herstellung von Substanzen, und sind insbesondere auch wirksam in PIS-Stämmen.

Im Rahmen der Erfindung werden zweitens neue Genstrukturen zur Verfügung gestellt, die in rekombinanter Form a) ein Gen kodierend für eine Zucker-phosphorylierende Kinase oder Gene kodierend für eine Zucker-phosphorylierende Kinase und für ein Transportprotein zur PEP-unabhängigen Aufnahme eines betreffenden Zuckers, und b) mindestens ein Gen kodierend für eine Transaldolase oder für eine Transketolase enthalten. In diesen ersten und zweiten Genstruk-

turen wird bevorzugt, daß das Gen für die Kinase eine Hexosen-phosphorylierende Kinase kodiert und das Gen für das Transportprotein einen Facilitator kodiert.

Insbesondere stammen die Gene für die Kinase und für das Transportprotein aus *Zymomonas mobilis*. Die in den zweiten Genstrukturen genannten Gene für die Transaldolase und für die Transketolase stammen insbesondere aus *Escherichia coli*. Besonders vorteilhaft sind Genstrukturen, bei denen das Gen für die Kinase *glk* und das Gen für das Transportprotein *glf* aus *Zymomonas mobilis* ist, und bei denen gegebenenfalls das Gen für Transaldolase *talB* und das Gen für Transketolase *tktA* aus *Escherichia coli* ist.

Die Isolierung der entsprechenden Gene und die Transformation der Zellen erfolgt nach gängigen Methoden: Im Falle z. B. der Klonierung des Glucokinasegens *glk* oder des Transportgens *glf* aus *Zymomonas mobilis* eignet sich beispielsweise die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur gerichteten Amplifikation des Gens mit chromosomaler DNS aus *Zymomonas mobilis* Stämmen ATCC 29 191 oder ATCC 31 821 und weiterhin die heterologe Komplementation von *Escherichia coli*-Mutanten, die in Funktionen des PTS defekt sind und die deshalb z. B. keine Glucose transportieren können (Snoep J.T. et al., J. Bacteriol. 174 (1994) 1707-8; Parker C. et al., Mol. Microbiol. 15 (1995) 795-82; Weisser P. et al., J. Bacteriol. 177 (1995) 3351-4). Nach Isolierung der Gene und deren in vitro-Rekombination mit bekannten Vektoren mit niedriger Kopienzahl, wie z. B. pACYC184, pACYC177, pSC101 oder pZY507 (Weisser P. et al., J. Bacteriol. 177 (1995) 3351-4) erfolgt die Transformation der Wirtszelle durch chemische Methoden, Elektroporation, Transduktion oder Konjugation.

Im Falle des Gens *talB* und des Gens *tktA* aus *Escherichia coli* K-12 sind die vollständigen Nucleotidsequenzen bekannt (Yura T. et al., Nucl. Acid Res., 20 (1992) 3305-8; Sprenger G.A., Biochim. Biophys. 1216 (1993) 307-10; Sprenger G.A. et al., J. Bacteriol. 177 (1995) 5930-9) und in Datenbanken wie beim EMBL in Heidelberg hinterlegt. Im Falle der Klonierung des *talB*-Gens aus *Escherichia coli* eignet PCR zur gerichteten Amplifikation des Gens mit chromosomaler DNS aus *Escherichia coli* K-12 Stämmen (Sprenger G.A. et al., J. Bacteriol. 177 (1995) 5930-9). Im Falle der Klonierung des *tktA*-Gens aus *Escherichia coli* eignet sich beispielsweise die homologe Komplementation einer Transketolase-defizienten Mutante (Sprenger G.A. in: Bisswanger H. et al., Biochemistry and physiology of thiamine diphosphate enzymes, VCH (1991) 322-6).

Das isolierte Kinase-Gen kann mit einem oder mehreren der im Rahmen der Erfindung beschriebenen Gene in jeglicher Kombination in eine Genstruktur oder in mehrere Genstrukturen integriert werden. Ohne die genaue Verteilung auf Genstrukturen zu berücksichtigen, führt dies zu Kombinationen wie z. B. *glk*, *glk* + *talB*, *glk* + *tktA*, *glk* + *glf* + *talB*, *glk* + *glf* + *tktA*, *glk* + *talB* + *tktA* oder *glk* + *glf* + *talB* + *tktA*. Bei der Verteilung der Gene wird *glf* vorzugsweise in niedriger Kopienzahl in die Genstruktur oder die Genstrukturen eingebracht, um mögliche negative Auswirkungen einer Überexpression eines Membranproteins zu vermeiden. Vorteilhaft sind Genstrukturen, die mindestens eine, einem der Gene zugeordnete, regulatorische Gensequenz enthalten. So kann eine Verstärkung regulatorischer Elemente vorzugsweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem insbesondere die Transkriptionssignale verstärkt werden. Dies kann beispielsweise dadurch erfolgen, daß durch Veränderung der den Strukturgenen vorgeschalteten Promotorsequenzen die Wirksamkeit des Promotors oder der Promotoren erhöht wird oder indem die Promotoren komplett durch wirksamere Promotoren ersetzt werden. Auch kann eine Verstärkung der Transkription durch entsprechende Beeinflussung eines den Genen zugeordneten Regulatorgens erfolgen; daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der Boten-RNS (m-RNS) verbessert wird.

Am geeignetsten sind Genstrukturen, in denen mindestens eines der beschriebenen Gene so eingebaut ist, daß es unter Kontrolle eines induzierbaren Promotors steht.

Bei der Anordnung der Gene auf einer erfindungsgemäßen Genstruktur kann ein Promotor vor einem Gen oder als gemeinsamer Promotor vor mehreren Genen liegen oder es können zwei gegenläufige Promotoren verwendet werden, zwischen denen die Gene so angeordnet sind, daß sie gegenläufig abgelesen werden. Dabei kann beispielsweise das *glf*-Gen vor einem schwächeren Promotor (z. B. *P_{lac}*) und weitere Gene unter der Kontrolle des *tac*-Promotors liegen. Den in einer Genstruktur enthaltenen Genen, mit oder ohne vorgeschaltetem Promotor bzw. mit oder ohne zugeordnetem Regulatorgen können ein oder mehrere DNS-Sequenzen vor- und/oder nachgeschaltet sein. Durch die Verwendung von induzierbaren Promotorelementen z. B. *lacI^{UV}/P_{tac}* besteht die Möglichkeit der Zuschaltung neuer Funktionen (Induktion der Enzymsynthese) z. B. durch Zugabe von chemischen Induktoren wie Isopropylthiogalactosid (IPTG).

Die Aufgabe der Erfindung wird auch dadurch gelöst, daß transformierte Zellen bereitgestellt werden, die in replizierbarer Form eine erfindungsgemäße Genstruktur enthalten.

Als transformierte Zelle im Sinne der Erfindung ist jeder Mikroorganismus zu verstehen, der eine erfindungsgemäße Genstruktur trägt, die die verstärkte Bildung von Substanzen in der Zelle bewirkt. Die Transformation der Wirtszellen kann durch chemische Methoden (Hanahan D. J. Mol. Biol. 166 (1983) 557-580), sowie auch durch Elektroporation, Konjugation oder Transduktion erfolgen.

Es ist vorteilhaft für die Transformation Wirtszellen einzusetzen, in denen ein oder mehrere Enzyme, die zusätzlich an der Synthese der Substanzen beteiligt sind, dereguliert und/oder in ihrer Aktivität erhöht sind.

Mit der die jeweiligen Gene enthaltenden Genstruktur wird ein, eine aromatische Aminosäure oder eine andere erfindungsgemäße Substanz produzierender Mikroorganismus-Stamm, insbesondere *Escherichia coli*, transformiert. Es ist von Vorteil für die Transformation mit den Genstrukturen Wirtszellen einzusetzen, in denen, sofern anwesend, das PLP-abhängige Zuckeraufnahmesystem in seiner Aktivität vermindert oder ausgeschaltet ist.

Insbesondere werden transformierte Zellen bereitgestellt, die in der Lage sind, eine aromatische Aminosäure zu produzieren, wobei die aromatische Aminosäure vorzugsweise L-Phenylalanin ist.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren und dem nach der Lehre der Erfindung transformierten Mikroorganismus kann ein breites Substratspektrum für die Produktion von Substanzen eingesetzt werden. Im Rahmen der Erfindung wird somit auch ein Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Substanzen bereitgestellt in dem erfindungsgemäße transformierte Zellen in denen eine Genstruktur vorliegt, die mindestens eine einem der Gene zugeordnete, regulatorische Gensequenz enthält, kultiviert werden und wobei die Induktion der Enzymsynthese in den Mikroorganismen nach mindestens 2 Zellteilungen (Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase) erfolgt. Die Produktion der Mikroorganismen kann somit un-

abhängig von deren Wachstum gesteigert werden.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden transformierte Zellen eingesetzt, die außer PEP auch andere Zentralstoffwechselmetabolite in erhöhter Verfügbarkeit enthalten. Dazu zählen z. B. α -Oxoglutarat oder Oxalacetat, die aus intrazellulären Syntheseprozessen resultieren, oder aber durch Zufütterung der entsprechenden Substanzen, oder ihrer Vorläufer, wie z. B. Fumarat oder Malat als Metaboliten des Zitronensäurezyklus, den wachsenden Zellen zur Verfügung gestellt werden.

Bei DSMZ sind unter den Bedingungen des Budapestervertrages die folgenden Stämme hinterlegt:

DSMZ 11208	<i>Escherichia coli</i> AT2471/pZY507glk	10
DSMZ 11207	<i>Escherichia coli</i> AT2471/pZY507glfglk	
DSMZ 11206	<i>Escherichia coli</i> AT2471GP704glfint PTS ⁺	15
DSMZ 11205	<i>Escherichia coli</i> AT2471glfint PTS ⁻	

Der verwendete Wirtsorganismus AT2471 wurde von Taylor und Trotter (Bacteriol. Rev. 13 (1967) 332-53) bei der CGSC unter der Nummer 4510 hinterlegt und ist frei erhältlich.

Im Folgenden sollen die verwendeten Materialien und Methoden angegeben, sowie die Erfindung durch experimentelle Beispiele und Vergleichsbeispiele unterbaut werden:

Allgemeine Methoden

Im Rahmen der genetischen Arbeiten wurden Stämme von *E. coli*, sofern nicht anderweitig erwähnt, auf LB-Medium bestehend aus Difco Bacto Trypton (10 g · l⁻¹), Difco-Hefeextrakt (5 g · l⁻¹) und NaCl (10 g · l⁻¹) kultiviert. In Abhängigkeit von den Resistenzeigenschaften der verwendeten Stämme wurde, sofern nötig, dem Medium Carbenicillin (20-100 mg · l⁻¹) und/oder Chloramphenicol (17-34 mg · l⁻¹) zugesetzt. Carbenicillin wurde dabei zuvor in Wasser und Chloramphenicol in Ethanol gelöst und dem bereits autoklavierten Medium steriltfiltriert zugegeben. Zur Herstellung von Agarplatten wurde dem LB-Medium Difco Bacto Agar (1,5%) zugesetzt.

Plasmid-DNS aus *E. coli* wurde mittels alkalischer Lyse unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen Systems (Quiagen, Hilden) isoliert. Die Isolation von chromosomaler DNS aus *E. coli* und *Z. mobilis* erfolgte nach Chen und Kuo (Nucl. Acid Res. 21 (1993) 2260).

Die Verwendung von Restriktionsenzymen, DNS-Polymerase I, Alkalische Phosphatase, RNase und T4 DNS-Ligase erfolgte nach den Instruktionen der Produzenten (Boehringer, Mannheim, D oder Promega, Heidelberg, D). Zur Restriktionsanalyse wurden die DNS-Fragmente in Agarosegelen (0,8%) aufgetrennt und mittels Extraktion unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen Systems (Jetsoorb Genomed, Bad Oeynhausen, D) aus Agarose isoliert.

Für Southern Analysen wurde Chromosomale DNS (10 µg) mit Restriktionsenzymen verdaut, über Gelelektrophorese der Größe nach getrennt und mittels vakuumvermittelter Diffusion (VacuGene System, Pharmacia, Freiburg, D) auf eine Nylonmembran transferiert (Nytran 13, Schleicher und Schuell, Dassel, D). Entsprechende DNS-Bruchstücke wurden isoliert, mit Digoxigenin-dUTP markiert und als Probe verwendet. Markierung, Hybridisierung, Waschvorgänge, sowie die Detektion wurden unter Zuhilfenahme eines kommerziell erhältlichen Markierungs- und Detektionssystems (Boehringer, Mannheim, D) ausgeführt.

Zur Transformation der Zellen wurden diese für 2,5-3 h in LB-Medium (5 ml-Röhrchen) bei 37°C und 200 U · min⁻¹ inkubiert. Bei einer optischen Dichte (620 nm) von ca. 0,4 wurden die Zellen abzentrifugiert und in einem Zehntel des Volumens in TSS (LB-Medium mit 10% (w/v) PEG 8000, 5% (v/v) DMSO und 50 mM MgCl₂) aufgenommen. Nach 30-minütiger Inkubation bei 4°C mit 0,1 bis 100 ng DNS und anschließender Inkubation bei 37°C für 1 h wurden die Zellen auf LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert.

Beispiel 1

Bereitung von pZY507glk und pZY507glfglk als Vorbilder erfindungsgemäßer, plasmidbasierter Genstrukturen

Plasmid pZY507 (Weisser et. al. 1995 J. Bacteriol 177: 3351-3345) wurde mit den Restriktionsenzymen BamHI und HindIII geöffnet und das größere Fragment (10,1 kB) wurde isoliert. Die Gene glk und glf wurden, wie durch Weisser et al. (J. Bacteriol. 177 (1995) 3351-3354) beschrieben über PCR (Mullis K.B. et al., Meth. Enzymol. 155 (1987) 335-50) erhalten und amplifiziert. Für die Amplifizierung des glk-Gens wurde chromosomale DNS von *Zymomonas mobilis* verwendet. Dabei wurden durch die Wahl der Primer zusätzliche Schnittstellen eingeführt (KpnI und HindIII). Das glf-Gen wurde unter Verwendung des Plasmids pZY600 (Weisser et. al. 1995 J. Bacteriol 177: 3351-3345) als Matrize amplifiziert. Dabei wurde durch die Wahl der Primer eine BamHI- und eine KpnI-Schnittstelle eingeführt. Unter Verwendung dieser singulären Schnittstellen wurden die Gene in verschiedenen Kombinationen in den Vektor pZY507 eingebracht. Nach Transformation von *E. coli* und Klonierung der Transformanten wurden die rekombinierten Plasmide pZY507glk, pZY507glf, pZY507glfglk erhalten. Diese Vektoren führen zu Chloramphenicol-Resistenz, enthalten das lac^R-lac-Propromotorsystem und haben eine niedrige Kopienzahl.

Die Aufbewahrung der erhaltenen Transformanten erfolgte auf LB-Medium in Form von Glycerinkulturen (30%) bei 80°C. Bei Bedarf wurden die Glycerinkulturen direkt vor dem Gebrauch aufgetaut.

Beispiel 2

Bestimmung der Enzymaktivität einer Glucokinase

5 Zur Bestimmung der Aktivität der Glucokinase wurden die Zellen von *E. coli* AT2471 sowie von der entsprechenden das Plasmid pZY507glf_{gk} tragenden Mutante AT2471/pZY507glf_{gk} in mineralischem Medium kultiviert. Dies bestand aus Natriumcitrat · 3H₂O (1,0 g · l⁻¹), MgSO₄ · 7H₂O (0,3 g · l⁻¹), KH₂PO₄ (3,0 g · l⁻¹), K₂HPO₄ (12,0 g · l⁻¹), NaCl 0,1 (g · l⁻¹), (NH₄)₂SO₄ (5,0 g · l⁻¹), CaCl₂ · 2H₂O (15,0 mg · l⁻¹), FeSO₄ · 7H₂O (0,75 g · l⁻¹), und L-Tyrosin (0,04 g · l⁻¹). Die Zugabe weiterer Minerale erfolgte über eine Spurenelementlösung (1 ml · l⁻¹) zusammengesetzt aus

10 Al₂(SO₄)₃ · 18H₂O (2,0 g · l⁻¹), CoSO₄ · 6H₂O (0,7 g · l⁻¹), CuSO₄ · 5H₂O (2,5 g · l⁻¹), H₃BO₃ (0,5 mg · l⁻¹), MnCl₂ · 4H₂O (20,0 g · l⁻¹), Na₂MoO₄ · 2H₂O (3,0 g · l⁻¹), NiSO₄ · 3H₂O (2,0 g · l⁻¹) und ZnSO₄ · 7H₂O (15,0 g · l⁻¹). Vitamin B1 (5,0 mg · l⁻¹) wurde in Wasser gelöst und dem Medium nach dem Autoklavieren sterilfiltriert zugegeben, ebenso wie bei Bedarf Carbenicillin bzw. Carbenicillin und Chloramphenicol. Glucose (30 g · l⁻¹) wurde separat autoklaviert und dem Medium ebenfalls nach dem Autoklavieren zugefügt.

15 Für die Experimente wurden Schüttelkolben (1000 ml mit 100 ml mineralischem Medium) mit 2 ml Glycerinkultur angeimpft und bei 37°C und 150 U · min⁻¹ für 72 h auf einem Kreisschüttler inkubiert. Die Induktion der Zellen durch Zugabe von 15–100 mM IPTG erfolgte nach etwa 7 Teilungen nach Erreichen einer optischen Dichte (620 nm) von ≈ 1. Zur Kontrolle der Induktion der Zellen wurden parallele Versuchsansätze durchgeführt, von denen ein Ansatz durch Zugabe von IPTG (20 µM) induziert wurde. Direkt vor der Zugabe des Induktors in die entsprechenden Kolben, sowie 1

20 und 3 h nach dem Zeitpunkt der Induktion wurden aus allen Ansätzen 20 ml Kulturbrühe entnommen und die Zellen bei 4°C für 10 min bei 6000 g sedimentiert.

Die geernteten Zellen wurden in 100 mM Tris/HCl-Puffer (pH 8,0) mit 1,2 mM ATP und 11,2 mM MgCl₂ gewaschen. Die Zellen des Sediments wurden mittels Ultraschall (Branson Sonifier 250 mit Microtip) in einem Beschallungszyklus von 25% und mit einer Intensität von 40 Watt für 4 min pro ml Zellsuspension aufgeschlossen. Nach Zentrifugation für

25 30 min bei 18 000 g und 4°C wurde der Überstand (Rohextrakt) für die Messung der Aktivität der Glucokinase verwendet.

Die Bestimmung der Aktivität der Glucokinase im Rohextrakt erfolgte nach der von Doelle et al. (Eur. J. Appl. Microbiol. 14 (1982) 241–246) beschriebenen Methode. Der Umsatz von 1 µmol NADH pro min wurde als 1 U definiert.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration im Rohextrakt erfolgte nach Bradford M.M. (Anal. Biochem. 72 (1976) 248–254) unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen Farbreagenzes. Als Standard wurde Rinderserumalbumin verwendet.

Tabelle 2 zeigt die Ergebnisse der Enzymmessungen bei der Verwendung des Wirtstammes *E. coli* 2471, sowie dessen Mutante *E. coli* 2471/pZY507glf_{gk}. Zum Zeitpunkt der Induktion wurde für beide Stämme eine Glucokinaseaktivität um 23 mU · (mg Protein)⁻¹ detektiert. Während sich diese Aktivität nach drei weiteren Stunden der Kultivierung für

35 den Wirtstamm auf lediglich 36 mU · (mg Protein)⁻¹ steigerte, konnte für den das Plasmid pZY507glf_{gk} tragenden Stamm eine Erhöhung der Glucokinaseaktivität auf 112 mU · (mg Protein)⁻¹ festgestellt werden. Durch Induktion der mit der erfindungsgemäßen Genstruktur transformierten Zellen konnte die Aktivität der Glucokinase weiter auf 657 mU · (mg Protein)⁻¹ erhöht werden, was im Vergleich zum nicht induzierten Wirtstamm einer Steigerung um den Faktor 18,3 entsprach.

Beispiel 3

Produktion von Substanzen unter Verwendung von Stämmen, die eine erhöhte Glucokinaseaktivität aufzeigen, bzw. in denen zusätzlich zur erhöhten Aktivität der Glucokinase auch ein PEP-unabhängiges Zuckeraufnahmesystem exprimiert

45 ist

Der Wirtstamm *Escherichia coli* AT2471, sowie dessen einer der Plasmide pZY507glk oder pZYglf_{gk} tragenden Transformanten wurden in jeweils parallelen Ansätzen unter den in Beispiel 2 beschriebenen Standardbedingungen für 72 h kultiviert. Nach 24 und 48 h wurde der pII-Wert der Kulturen gemessen und bei Bedarf durch Zugabe von KOH

50 (45%) auf den Startwert von 7,2 zurückgebracht. Desweiteren wurden nach 24, 48 und 72 h Proben zur Bestimmung der optischen Dichte, sowie der Glucose- und der L-Phenylalaninkonzentration genommen. Die Phenylalaninkonzentration wurde mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC, Hewlett Packard, München, D) in Verbindung mit Fluoreszenzdetektion (Extinktion 335 nm, Emission 570 nm) ermittelt. Als feste Phase wurde eine Nucleosil-120-8-C18-Säule (250 x 4,6 mm) verwendet; die Elution erfolgte unter Verwendung eines Gradienten (Eluent A: 90% 50 mM Phosphorsäure, 10% Methanol, pH 2,5; Eluent B: 20% 50 mM Phosphorsäure, 80% Methanol, pH 2,5; Gradient: 0–8 min 100% A, 8–13 min 0% A, 13–19 min 100% A). Die Elutionsgeschwindigkeit wurde auf 1,0 ml · min⁻¹ festgesetzt; die Säulentemperatur auf 40°C. Die Nachsäulenderivatisierung erfolgte unter Verwendung von o-Phthaldialdehyd in einer Reaktionskapillare (14 m · 0,35 mm) bei Raumtemperatur. Für L-Phenylalanin wurde unter den beschriebenen Bedingungen eine Retentionszeit von 6,7 min ermittelt.

60 Durch die Messung der Glucosekonzentration mittels enzymatischer Teststreifen (Diabur, Boehringer Mannheim, D) und, abhängig von den Resultaten, Nachdosieren von 2 ml einer konzentrierten Glucoselösung (500 g · l⁻¹) wurde sichergestellt, daß keine Glucoselimitierung in den Versuchsansätzen auftrat. Nach einer Inkubationszeit von 48 h wurde im Vergleich zu einem (Phenylalanin)-Indexwert von 100 für den nicht induzierten Wirtstamm *E. coli* 2471, durch Inkubation des Wirtstammes ein Phenylalaninwert von 119 ermöglicht. Durch das alleinige Erhöhen der Aktivität der Glucokinase durch Induktion des transformierten Stammes *E. coli* AT2471/pZY507glk wurde ein Indexwert von 141 ermöglicht. Das Einbringen des Plasmides pZY507glf_{gk} in den Wirtstamm erlaubte statt dessen sogar ohne Induktion eine Erhöhung der Phenylalaninproduktion auf einen Wert von 149, der durch Induktion der Zellen noch weiter auf 171 gesteigert werden konnte. Dies entsprach einer Erhöhung von 44% im Vergleich zum induzierten Wirtstamm.

Dieses Ergebnis zeigt den erfindungsgemäßen, die Synthese aromatischer Verbindungen erhöhenden, positiven Effekt, der Erhöhung der Aktivität einer Glucokinase in entsprechenden Microorganismen. Desweiteren wird auch die sich positive auf die Herstellung dieser Substanzen auswirkende zusätzliche Erhöhung der Aktivität einer Glucokinase in Stämmen mit bereits erhöhter Anwesenheit eines Facilitatorproteins bzw. zusätzlichen Erhöhung der Anwesenheit eines Facilitatorproteins in Stämmen mit bereits erhöhter Glucokinaseaktivität demonstriert.

Beispiel 4

Produktion von Substanzen unter Verwendung von PTS⁻-Mutanten in denen zusätzlich zur erhöhten Glucokinaseaktivität ein PEP-unabhängiges Zuckertransportsystem exprimiert ist

Zur Integration des glf-Gens in Gene, die für Komponenten des PTS-Systems von *E. coli* kodieren, wurde das Plasmid pPTS1 (siehe Tabelle 1) mit BglII verdaut und mit Klenow-Fragment behandelt. Die singuläre Schnittstelle liegt im ptsI-Gen. Das glf-Gen wurde als BamHI-KpnI-Fragment aus dem Plasmid pZY507glf_{glk} isoliert und ebenfalls mit Klenow-Fragment behandelt. Durch blunt-end-Ligation wurden Klone erhalten, die das glf in gleicher Orientierung wie die Gene ptsIII tragen. Aus dem resultierenden Plasmid pPTSglf konnte ein 4,6 kb PstII-Fragment erhalten werden, welches den 3'-Bereich des ptsII-Gens sowie ptsI mit integriertem glf und crr trägt. Dieses Fragment wurde in die ECoRV-Schnittstelle des Vektors pGP704 ligiert. Da dieser Vektor nur in λ pir-Stämmen repliziert werden kann, haben Transformanten, die diesen Phagen nicht tragen, den Vektor ins Chromosom integriert, wenn sie auf Carbenicillin wachsen können (Miller V.L. et al., J. Bacteriol. 170 (1988) 2575-83). Die Integration wurde mittels Southern Blot Analyse überprüft. Die erhaltenen Transformanten enthielten neben dem glf-Gen auch die vollständigen PTS-Gene.

Bei einem zweiten homologen crossover kann der Vektoranteil herausrekombinieren, was zum Verlust der Carbenicillin-Resistenz führt. Da in diesem Falle die pts-Gene durch die Insertion des glf-Gens unterbrochen vorliegen, wird das PTS in diesen Mutanten nicht funktionell exprimiert. Die gewünschten PTS⁻-Mutanten wurden wie folgt selektioniert: Nach mehrmaligem Überimpfen der noch PTS⁺-Transformanten auf LB-Medium ohne Antibiotika wurden Aliquots der Zellsuspension auf LB-Platten mit $100 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ Phosphomycin ausplattiert. PTS⁻-Mutanten können auf diesen Platten wachsen. Wachsende Klone wurden auf LB-Platten mit entweder Phosphomycin oder mit $20 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ Carbenicillin ausgestrichen. Von Klonen, die erneutes Wachstum auf den Phosphomycin-Platten, nicht aber auf den Carbenicillin Platten zeigten, wurde chromosomale DNS isoliert. Die Integration des glf-Gens in die Gene, die für das PTS-System kodieren, wurde durch Southern-Analyse bestätigt. Entsprechende Mutanten wurden als phänotypisch PTS-defizient identifiziert. Ein Klon wurde als Wirtsorganismus *E. coli* AT2471glf_{int}PTS⁻ ausgewählt und für die Transformationen (s. oben) mit Plasmid pZY507glk eingesetzt. Den für Beispiel 2 und 3 beschriebenen experimentellen Bedingungen folgend, wurden die PTS-negative Mutante *E. coli* AT2471glf_{int}PTS⁻/pZY507glk, sowie der korrespondierende Wirtsstamm AT2471glf_{int}PTS⁻ in je zwei Parallelansätzen kultiviert und die Zellen je eines Ansatzes nach ca. 7 Teilungen induziert.

Durch die Induktion reduzierte sich die Syntheseleistung des Wirtstammes, ausgehend von einem Indexwert von 100 im Falle nicht vorhandener Induktion, auf einen Wert von 56. Im Vergleich dazu konnte in Kulturen des transformierten Stammes AT2471glf_{int}PTS⁻/pZY507glk bereits ohne Induktion ein Phenylalanin-Indexwert von 151 erreicht werden, der dann durch Induktion auf 174 erhöht werden konnte.

Dieses Ergebnis zeigt, daß die alleinige Erhöhung der Glucokinaseaktivität für die Synthese von Phenylalanin auch in jenen Mikroorganismen positiv wirkt, die sich durch ein in seiner Aktivität vermindertes oder gänzlich ausgeschaltetes PTS-System auszeichnen und in denen gleichzeitig ein PEP-unabhängiges Zuckeraufnahmesystem integriert ist.

DE 196 44 567 A 1

Tabelle 1

Stämme und Plasmide	Genotyp / Charakteristika	Quelle oder Referenz
E. coli AT2471	tyrA ⁻ , relA ⁻ , spoT ⁻ , thi-1	Taylor und Trotter, Bacteriol. Rev. 13 (1967) 332-53
E. coli SY327	araD, Δ(lac-pro), Rif ^r , .recA56, pir-Funktion des Phagen λ	Miller et al., J. Bacteriol. 170 (1988) 2575-83
E. coli CC118	Δ(ara-leu), araD, ΔlacX74, galE, galK, phoA20, thi-1, rpsE, rpoB, argE (Am), recA1, λpir lysogen	Manoil et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 82 (1985) 8129-33
pZY507	Cm ^r	Weisser et al., J. Bacteriol. 177 (1995) 3351-4
pZY507glfglk	glf- und glk-Gene aus Z. mobilis in pZY507	Weisser et al., J. Bacteriol. 177 (1995) 3351-4
pZY557	pZY507, multiple Klonierstelle von pUCBM20Cm ^r	Sprenger, unveröffentlicht
pACYC184	Cm ^r , Tet ^r	Chang und Cohen, J. Bacteriol. 134 (1978) 1141-1156
pDIA3206	Ap ^r , 11,5 kb Insert aus E. coli K-12 Chromosom inklusive ptsHI-crr Gene	DeReuse et al., J. Bacteriol. 170 (1988) 3827-37
pPTS1	pACYC184 mit 4 kb-ClaI-Fragment, welches die Gene ptsHI, crr aus pDIA3206 enthält; Cm ^r	Jahreis, Universität Osnabrück, unveröffentlicht
pGP704	Amp ^r	Miller et al., J. Bacteriol. 170 (1988) 2575-83

Tabelle 2

Mikroorganismus	Zeit nach Induktion / h	Glucokinaseaktivität / mU · (mg Protein) ⁻¹	
		ohne Induktion	mit Induktion
<i>Escherichia coli</i> AT2471	0	21	
	1		
	3	36	
<i>Escherichia coli</i> AT2471/pZY507glfglk	0	23	25
	1	63	202
	3	112	657

Patentansprüche

1. Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Substanzen, bei dem die Aktivität einer Zucker-phosphorylierenden Kinase in einem diese Substanzen produzierenden Mikroorganismus erhöht wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß Substanzen hergestellt werden an deren Synthese Phosphoenolpyruvat (PEP) beteiligt ist.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Kinase eine Hexosen-phosphorylierende Kinase ist.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Kinase in dem Mikroorganismus aus *Zymomonas mobilis* stammt.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Kinase Glucokinase (Glc) aus *Zymomonas mobilis* ist.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß zusätzlich die Aktivität eines Transportproteins zur PEP-unabhängigen Aufnahme eines von der Kinase zu phosphorylierenden Zuckers erhöht wird.
7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Aktivität eines Transportproteins zur PEP-unabhängigen Aufnahme eines betreffenden Zuckers in einem Substanzen produzierenden Mikroorganismus, der zur Aufnahme eines Zuckers mittels eines PEP-abhängigen Aufnahmesystems befähigt ist, erhöht wird.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Transportprotein ein Facilitator ist.
9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß der Facilitator das Glucosefacilitator-Protein (Glf) aus *Zymomonas mobilis* ist.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß zusätzlich die Aktivität einer Transaldolase und/oder einer Transketolase erhöht wird.
11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Aktivität einer Transaldolase und/oder einer Transketolase aus *Escherichia coli* erhöht wird.
12. Verfahren nach Anspruch 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Aktivität der Transaldolase B (TalB) und/oder der Transketolase A (TktA) aus *Escherichia coli* erhöht wird.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Aktivität des PEP-abhängigen Zuckeraufnahmesystems, sofern anwesend, dem natürlichen Niveau gegenüber vermindert ist.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Aktivität mindestens einer der folgenden Komponenten Zucker-phosphorylierende Kinase, Transportprotein, Transaldolase, Transketolase, gesteigert wird
 - a) durch Einführung der Gene
 - b) und/oder durch Erhöhen der Genkopienzahl
 - c) und/oder durch Erhöhen der Genexpression
 - d) und/oder durch Erhöhung der endogenen Aktivität der genannten Enzyme
 - e) und/oder durch Strukturänderung an den Enzymen
 - f) und/oder durch Verwendung von deregulierten Enzymen
 - g) und/oder durch Einführen von Genen, die für deregulierte Enzyme kodieren.
15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Steigerung der Aktivität dadurch erreicht wird, daß eine Integration des Gens oder der Gene in eine Genstruktur oder in mehrere Genstrukturen erfolgt, wobei das

Gen oder die Gene als einzelne Kopie oder in erhöhter Kopienzahl in die Genstruktur eingebracht wird.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß ein Mikroorganismus eingesetzt wird, in dem ein oder mehrere Enzyme, die zusätzlich an der Synthese der Substanzen beteiligt sind, dereguliert und/oder in ihrer Aktivität erhöht sind.

17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die hergestellte Substanz eine aromatische Aminosäure ist.

18. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß die aromatische Aminosäure L-Phenylalanin ist.

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß der eingesetzte Mikroorganismus der Gattung *Escherichia*, *Serratia*, *Bacillus*, *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* zugeordnet ist.

20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß der Mikroorganismus *Escherichia coli* ist.

21. Genstruktur enthaltend in rekombinanter Form ein Gen kodierend für eine Zucker-phosphorylierende Kinase und ein Gen für ein Transportprotein zur PEP-unabhängigen Aufnahme eines Zuckers, mit der Ausnahme von der Kombination der Gene für die Kinase *glk* und für das Transportprotein *glf* aus *Zymomonas mobilis*.

22. Genstruktur enthaltend in rekombinanter Form

a) ein Gen kodierend für eine Zucker-phosphorylierende Kinase oder Gene kodierend für eine Zucker-phosphorylierende Kinase und für ein Transportprotein zur PEP-unabhängigen Aufnahme eines betreffenden Zuckers, und

b) mindestens ein Gen kodierend für eine Transaldolase oder für eine Transketolase.

23. Genstruktur nach Anspruch 21 oder 22, dadurch gekennzeichnet, daß das Gen für die Zucker-phosphorylierende Kinase eine Hexosen-phosphorylierende Kinase kodiert und das Gen für das Transportprotein einen Facilitator kodiert.

24. Genstruktur nach einem der Ansprüche 21, bzw. 22 oder 23, dadurch gekennzeichnet, daß die Gene für die Kinase und für das Transportprotein aus *Zymomonas mobilis* stammen, und daß die Gene für die Transaldolase und für die Transketolase aus *Escherichia coli* stammen.

25. Genstruktur nach einem der Ansprüche 22 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß das Gen für die Kinase *glk* und das Gen für das Transportprotein *glf* aus *Zymomonas mobilis* ist, und das Gen für die Transaldolase *talB* und das Gen für die Transketolase *tktA* aus *Escherichia coli* ist.

26. Genstruktur nach einem der Ansprüche 22 bis 25, dadurch gekennzeichnet, daß das *glf*-Gen in niedriger Genkopienzahl in die Genstruktur eingeführt wird.

27. Genstruktur nach einem der Ansprüche 21 bis 26, dadurch gekennzeichnet, daß die Genstruktur mindestens eine, einem der Gene zugeordnete, regulatorische Gensequenz enthält.

28. Genstruktur nach einem der Ansprüche 21 bis 27, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eines der Gene in der Genstruktur so eingebaut ist, daß es unter Kontrolle eines induzierbaren Promotors steht.

29. Genstruktur nach Anspruch 22 bis 28, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens zwei der Gene unter Kontrolle von zwei gegenläufigen Promotoren stehen.

30. Transformierte Zelle, enthaltend in replizierbarer Form mindestens eine Genstruktur nach den Ansprüchen 21 bis 29.

31. Transformierte Zelle nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, daß ein oder mehrere Enzyme, die zusätzlich an der Synthese der Substanzen beteiligt sind, dereguliert und/oder in ihrer Aktivität erhöht sind.

32. Transformierte Zelle nach Anspruch 30 oder 31, dadurch gekennzeichnet, daß die Zelle eine *Escherichia coli*-Zelle ist.

33. Transformierte Zelle nach einem der Ansprüche 30 bis 32, dadurch gekennzeichnet, daß das PEP-abhängige Zuckeraufnahmesystem, sofern anwesend, in seiner Aktivität dem natürlichen Niveau gegenüber vermindert oder ausgeschaltet ist.

34. Transformierte Zelle nach einem der Ansprüche 30 bis 33, dadurch gekennzeichnet, daß sie in der Lage ist, eine aromatische Aminosäure zu produzieren.

35. Transformierte Zelle nach Anspruch 34, dadurch gekennzeichnet, daß die aromatische Aminosäure L-Phenylalanin ist.

36. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß transformierte Zellen nach einem der Ansprüche 30 bis 35, in denen eine Genstruktur nach Anspruch 28 oder 29 vorliegt, kultiviert werden und wobei die Induktion frühestens nach zwei Zellteilungen erfolgt.

37. Verfahren nach Anspruch 36, dadurch gekennzeichnet, daß die transformierte Zelle außer PEP auch andere Zentralstoffwechselmetabolite in erhöhter Verfügbarkeit enthält.